

BR 03 / 00 183



REC'D 12 MAY 2004

WIPO

PCT

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL


PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

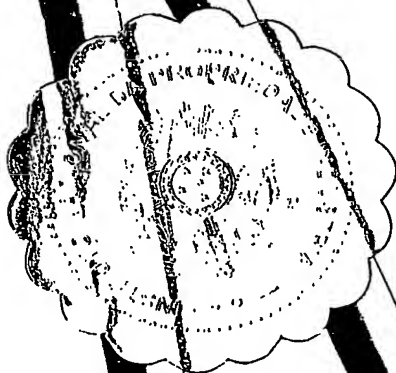
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0205000-5 de 09/12/2002.

BEST AVAILABLE COPY

Rio de Janeiro, 29 de Abril de 2004.


GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119



- 9 DEZ 11 42 012832

Protocolo

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



PI0205000-5

depósito

/

/

Depósito recebido pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial em data de depósito

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: DR. ANTONIO CARLOS MARTINS DE CAMARGO

1.2 Qualificação: PROFESSOR UNIVERSITÁRIO

1.3 CGC/CPF: 262.880.878-15

1.4 Endereço completo: Rua Mario Ferraz, 55 - Apto. 11 - Jardim Europa - São Paulo/SP - CEP: 01453-010.

1.5 Telefone: (11)3816-0989

FAX:

() continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição

☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada:

INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

VIDE FOLHA ANEXA

(X) continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido n° _____, de ____/____/____.

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

N° de depósito _____ Data de Depósito ____/____/____ (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
() Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)
- 7.1 Nome: **Mirian Akemi Furuie Hayashi**
7.2 Qualificação: **Farmacêutica Bioquímica - Pós Doutorando da Fapesp**
7.3 Endereço: **Alameda Fenão Cardim, 159 - Apto. 101 - Jardins - São Paulo - SP**
7.4 CEP: 7.5 Telefone: **(011) 3266-2859**
(X) continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

() em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

() em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome e CPF/CGC: **LLC INFO CONNECTION LTDA. P. 0340**
C.G.C.: 86.915.246/0001-09

10.2 Endereço: **RUA HERMENGARDA, 60 SALA 403 - MEIER - Rio de Janeiro - RJ**

10.3 CEP: **20.710-010** 10.4 Telefone **(21) 3899-2920 e 3899-2002**

11. **Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):**
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	11.5 Relatório descritivo	33 fls.
11.2 Procuração	01 fls.	11.6 Reivindicações	17 fls.
11.3 Documentos de prioridade	fls.	11.7 Desenhos	01 fls.
11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	11.8 Resumo	02 fls.
11.9 Outros (especificar): Título da Invenção (54), Inventor (72) - (Folha Anexa)			02 fls.
11.10 Total de folhas anexadas:			57 fls;

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

Rio, 09 de dezembro de 2002
Local e Data

Assinatura e Carimbo

DOUGLAS VIEIRA PINTO

Agente de Propriedade Industrial - 1339

Processo para a determinação da estrutura primária do RNA mensageiro codificante para a Endooligopeptidase Humana Recombinante - A hEOPA e da sua sequência protéica, para a determinação do gene da EOPA Humana e para a produção da EOPA humana recombinante; Processo de geração de anticorpo anti-EOPA Humana policlonais e em camundongos; Processo de caracterização e substratos sintéticos das propriedades Bioquímicas e Proteolíticas da hEOPA; Processo de identificação de inibidores da EOPA E Anticorpos inibidores da atividade catalítica e de interação com oligopeptídeos; Competidores e Antagonistas; Método de identificação de condições de patologias congênitas, infecciosas e degenerativas do sistema nervoso central e de determinação do papel da EOPA em processos imunológicos; Método de Diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças congênitas, infecciosas e degenerativas do Sistema nervoso Central; Uso de Inibidores e competidores e seus derivados, para o tratamento de patologias neurológicas e degenerações teciduais.

A invenção refere-se a endooligopeptidase A humana (hEOPA) recombinante, polinucleotídeos que codificam para a A hEOPA, polinucleotídeos que indentificam a expressão da hEOPA em animais e humanos, substratos sintéticos utilizados para a determinação da atividade proteolítica e chaperona

da hEOPA, anticorpos específicos e inibidores da sua atividade catalítica e de interação com oligopeptídeos, competidores e antagonistas da sua interação com outras proteínas e formação de complexos protéicos. A invenção também se refere a métodos para diagnóstico e/ou identificação de condições de patologias congênitas, infecciosas e degenerativas do sistema nervoso central e para disfunções psiquiátricas e de comportamento.

10. Propõe ainda, a aplicação de inibidores e competidores, incluindo anticorpos ou seus derivados, para o tratamento de patologias neurológicas e degenerações teciduais.

Mais especificamente, a presente invenção trata de uma proteína expressa no sistema nervoso central (SNC) com atividade proteolítica sobre substratos peptídicos e que apresenta uma estrutura protéica que determina a sua interação com oligopeptídeos e/ou proteínas determinando funções fisiológicas importantes como a migração de células neuronais, apresentação de antígenos, sinalização interneuronais (p.ex., sinalização para formação de sinapses), e biotransformação e/ou proteção (atividade "chaperon") de peptídeos bioativos.

A fim de atingir os objetivos da presente invenção é proposta uma Metodologia específica para a determinação da estrutura primária do RNA

mensageiro codificante para esta proteína e, portanto, também da sequência protéica da endooligopeptidase A humana.

Da mesma forma é provida na presente invenção a determinação da estrutura primária do gene da endooligopeptidase A e dos fatores que regulam a sua transcrição e expressão.

Adicionalmente também promoveu-se à caracterização da especificidade primária do referido gene, para a hidrólise de substratos (atividade proteolítica) e para interação com peptídeos e/ou proteínas (atividade chaperona), bem como, à geração ou aplicação de inibidores sintéticos ou naturais específicos que possam ser utilizados "in vitro", "ex vivo" ou "in vivo".

Ainda, como um outro objeto da presente invenção é descrita a geração de anticorpos específicos capazes de inibir a atividade catalítica do gene da endooligopeptidase A e de efetuarem o reconhecimento específico da EOPA em tecidos e fluidos biológicos.

Como consequência, um outro objeto da presente invenção é a determinação do padrão de distribuição desta proteína nos diversos tecidos e órgãos, normal ou patológico, de humanos e animais.

É previsto na presente invenção, a Inibição da atividade catalítica desta proteína,

(09)

ou chaperona, por substâncias naturais como especificamente as toxinas do veneno de serpentes.

Também como objetivos adicionais, provê-se a determinação da expressão e secreção desta
5 proteína em tecidos ou células tumorais; a sua expressão em células totipotentes e neuronais, principalmente, frente à diferenciação e à formação de neuritos e conexões sinápticas; bem como, a determinação e expressão em processos
10 patológicos degenerativos ou de reparo, especialmente do tecido nervoso e muscular estriado.

Os diversos objetivos da presente invenção forma alcançados nos diversos procedimentos que
15 são a seguir descritos.

Clonagem do cDNA e da sua sequência protéica humano que codifica a EOPA

A seleção de clones de uma biblioteca de cDNA de córtex cerebral humano adquirido
20 comercialmente da Stratagene (La Jolla, USA) realizada através de hibridizações utilizando sondas radioativas geradas a partir da sequência de cDNA codificante para a endooligopeptidase A de coelho anteriormente identificada e descrita pelos
25 inventores da presente invenção, (Hayashi et al., 2000), registrado no GenBank sob o Acc. No. AF015037 e AAB99905, para cDNA e proteína

respectivamente, permitiu o isolamento do cDNA codificante para a endooligopeptidase A humana.

Este cDNA de aproximadamente 2,4 kb foi completamente seqüenciado e foi depositado no GenBank sob o Acc. No. AF217798 e AAF24516, para cDNA e proteína respectivamente.

Para a determinação da estrutura primária do RNA mensageiro codificante para a EOPA e de sua seqüência protéica em mamíferos, foram efetuadas as seguintes etapas procedimentais:

- a) isolamento do RNA total de vários tecidos de animais, especificamente humano, através do método de extração com isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio ou utilizando o reagente Trizol® (GibcoBRL);
- b) purificação do RNA mensageiro a partir do RNA total obtido acima utilizando oligo dT celulose empacotado em colunas ou com a resina na forma de suspensão;
- c) análise da qualidade do RNA mensageiro obtido através da eletroforese em gel de agarose denaturante (contendo 1 a 2,5 % de formaldeído), seguido de coloração com brometo de etídeo ou corantes de ácidos nucléicos como o "Syber Green" (Molecular Dynamics), de fotodocumentação, e de análise por hibridização (Northern blot);

(11)

d) clonagem do RNA mensageiro obtido em vetor plasmidial, cosmídio ou fagos, de forma a permitir a sua amplificação "in vitro";

e) identificação e isolamento do inserto de cDNA codificante para a EOPA através da seleção de clones por hibridização, imuno-seleção com anticorpo específico anti-EOPA ou através da detecção da atividade específica da EOPA;

f) amplificação e isolamento do inserto de cDNA desejado por PCR ("polymerase chain reaction") ou por simples amplificação do vetor contendo este cDNA (crescimento de bactérias transformadas com o clone contendo o inserto de cDNA codificante para a EOPA) seguido de digestão com enzimas de restrição que permitam o seu isolamento;

g) alternativamente, a amplificação do cDNA desejado também pode ser realizada através da amplificação direta por PCR a partir do RNA mensageiro ou RNA total utilizando oligonucleotídeos específicos (RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction);

h) o cDNA, identificado e isolado conforme descrito no item anterior, deverá ser submetido ao seqüenciamento de toda a sua cadeia para permitir a determinação e dedução da respectiva seqüência primária, e também

possibilitar a análise da estrutura primária e ou secundária da respectiva proteína, além da análise de homologias com outras seqüências já anteriormente depositadas em bancos de dados específicos e disponíveis.

Expressão da EOPA recombinante

A EOPA humana pode ser expressa em sistemas heterólogos como, por exemplo, bactérias, leveduras, baculovírus, células em cultura, etc. A produção desta enzima recombinante, utilizando bactérias, foi realizada através da subclonagem do cDNA codificante para a endooligopeptidase A em vetor de expressão (p.ex., pProEx-HTc) em fase de leitura aberta, de forma a utilizar o sinal de início de transcrição (inclui a metionina inicial) do próprio vetor. A construção assim preparada, uma vez transfectada ou eletroporada em bactérias *E. coli*, permitem a indução da expressão, frente à adição de agentes como o IPTG (isopropil tiogalactosidase), da respectiva proteína recombinante na forma de fusão com uma proteína âncora ou com uma seqüência de poli-histidinas, que auxiliam no processo de identificação e purificação da proteína desejada.

A proteína recombinante assim obtida apresenta todas as características bioquímicas e

imunológicas idênticas às observadas para a proteína natural presente no cérebro humano.

A produção da EOPA recombinante especificamente em bactérias, compreende as seguintes etapas:

a) o cDNA codificante para a EOPA, isolado e identificado, deverá ser subclonado, em fase de leitura aberta, em vetor de expressão plasmidial que permita a produção da proteína desejada - EOPA, na forma recombinante ou na forma de fusão com proteínas ou oligopeptídeos âncora que permitam ou facilitem o processo de purificação da mesma;

b) o processo de produção da proteína recombinante ou na forma de fusão propriamente dita, requer a transformação de células hospedeiras (bactérias *E. coli* da linhagem

DH5 α ou BL21(DE3) ou similar) com a construção plasmidial descrita no item anterior, ou seja, contendo o inserto de cDNA codificante para a EOPA clonado em fase de leitura aberta em

vetor de expressão; esta transformação poderá ser realizada por simples choque térmico (transformação por "heat-shock") ou por eletroporação, em bactérias previamente preparadas para cada um destes fins;

c) as bactérias transformadas obtidas conforme descrito no item anterior devem ser

(14)

amplificadas através do seu cultivo em meio de cultura apropriado (normalmente meio LB contendo antibiótico de seleção) até atingir densidade ótica de aproximadamente 0,6 para leituras a 560 a 600 nm; nesta fase a produção da proteína desejada é induzida através da adição de compostos indutores de expressão, como por exemplo o IPTG (isopropyl-tiogalactosidade) na concentração final em torno de 0,5 a 1 mM, seguido de incubação a 30°C a 37°C, sob agitação;

d) as bactérias contendo a proteína desejada são coletadas por centrifugação e podem ser estocadas a -20°C ou podem ser processadas imediatamente, ou seja, as bactérias devem ser rompidas, por sonicagem ou pressão mecânica, para que a proteína recombinante ou de fusão presente no seu citoplasma seja liberada para o meio, onde a proteína na forma de fusão poderá ser recuperada e purificada utilizando colunas de afinidade ou por eletroforese ou cromatografia em fase líquida;

e) quando a proteína é produzida na forma de fusão, a mesma pode ser separada das demais proteínas solúveis da bactéria (proteínas contaminantes) através da utilização de colunas de afinidade adequadas, ou seja, colunas contendo o metal níquel imobilizado

para fusão com poli-histidinas ou a resina glutathiona-sepharose para as proteínas em fusão com a GST (glutathiona-S-transferase); e ainda, em seguida, a proteína recombinante então poderá ser obtida através da clivagem da proteína ou polipeptídeo âncora através da digestão com proteases específicas (tais como trombina, fator X, enteroquinase, etc.), cuja sequência consenso de reconhecimento e de clivagem tenha sido previamente inserido no sítio de fusão entre a âncora e a proteína recombinante desejada;

f) a pureza e qualidade da proteína recombinante assim obtida pode ser avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE), Western blot, espectroscopia de massa, e medidas da sua atividade específica por cinética enzimática utilizando substratos peptídicos sintéticos ou naturais.

20 Determinação da sequência do gene da EOPA humana

A sequência completa do gene humano que codifica para a endooligopeptidase A foi determinada através da análise da sequência do genoma humano disponível interativamente em bancos de dados públicos. Verificou-se que o gene é constituído por 9 exons e 10 introns, e se estende por aproximadamente 40 kb. Este gene está

localizado no cromossomo 17p12.9, relativamente próximo do locus do gene da p53 (aproximadamente 0,7 cM), e está no mesmo braço do cromossomo 17 onde se encontra o gene da Lis1 (17p13.3). No segmento 5' a montante do gene, englobando a região promotora, foram encontrados sítios de ligação para fatores de regulação de transcrição, tais como: AP1, cMyb, SP1, nMyc, cMyc, entre outros. Promove-se, na sequência, à comprovação da importância de cada um destes fatores na regulação da transcrição deste gene.

Geração do anticorpo anti-EOPA apresentando
atividade anticatalítica e discriminação de
proteínas análogas

Foram gerados anticorpos policlonais em ratos, camundongos e coelho a partir de imunizações com a EOPA natural purificada do cérebro de coelho ou com a proteína recombinante ativa produzida em bactérias. Camundongos machos da linhagem Balb-C, com 7 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 a 22 g, foram imunizados com a EOPA humana natural purificada ou recombinante cataliticamente ativa. Para cada uma das quatro imunizações, 2 µg da proteína purificada ou 3 µg da proteína recombinante absorvida em hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$ foram injetados via intradérmica em intervalos semanais. Amostras do

sangue foram coletadas uma semana após a última imunização e o soro foi estocado a -20°C . O título do anti-soro obtido foi avaliado através de ensaios de ELISA utilizando o antígeno apropriado.

5 A atividade anticatalítica do anti-soro obtida foi monitorada por injeções em HPLC; utilizando o peptídeo natural bradicinina como substrato. O anti-soro foi pré-aquecido a 55°C por 5 minutos para eliminar qualquer atividade peptidásica contaminante. Os testes de padronização do anticorpo mostraram que ao incubar o anticorpo anti-EOPA com a rEOPA por 30 minutos à 37°C , sua eficiência inibitória máxima era alcançada e que a incubação do anticorpo com as enzimas thimet

10 oligopeptidase e neurolisina não alteravam suas atividades. Com este anticorpo em mãos, foi possível discriminar as atividades da EOPA, de enzimas análogas mas não homólogas, isto é, a thimet oligopeptidase e da neurolisina presentes

20 na fração citosólica preparada a partir do homogenato de cérebro e de outros tecidos do rato, frente ao substrato Abz-GFAP(FRQ)-EDDnp que apresenta eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) de $2,6 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$ para a EOPA. Ou seja, a atividade da EOPA

25 foi inibida pelo anticorpo anti-EOPA, a atividade da thimet oligopeptidase pela adição do ATP e a atividade da neurolisina pelo dipeptídeo Pro-Ile. A atividade restante após esta série de inibições

seria provavelmente proveniente da ação de outras enzimas proteolíticas citosólicas, como a NEP (neutral endopeptidase) e a EOPB (endooligopeptidase B), por exemplo.

Propriedades proteolíticas e características bioquímicas da endooligopeptidase A

Ensaio cinéticos utilizando substratos peptídicos naturais e sintéticos comprovaram que a proteína natural e a recombinante apresentam exatamente as mesmas características bioquímicas e de especificidade (Hayashi et al., 2000).

A EOPA é uma endopeptidase tiol-ativável, insensível ao EDTA, com peso molecular em torno de 43 kDa e pode ser encontrada associada a outras proteínas do citosol gerando complexos de massa molecular em torno de 70 kDa.

A proteína natural, assim como a recombinante é capaz de hidrolisar seletivamente peptídeos de 7 a 13 resíduos de aminoácidos, e apresenta ponto isoelétrico entre 5,22 e 5,50 (Medeiros, 1992). Esta enzima hidrolisa especificamente a ligação Phe⁵-Ser⁶ da bradicinina (Camargo et al., 1973) e a ligação Arg⁸-Arg⁹ da neurotensina (Camargo et al., 1983), e libera ainda [Met⁵]- ou [Leu⁵]-encefalinas de vários peptídeos contendo encefalinas em sua seqüência (Camargo et al., 1985; 1987), o que sugere o seu

possível envolvimento na biotransformação de peptídeos bioativos.

Utilizando diversos neuropeptídeos como substrato, foi observado que o mecanismo de catálise da EOPA não poderia ser explicado satisfatoriamente pelo modelo proposto por Schechter e Berger (1967), pois a sequência primária do substrato ao redor da ligação peptídica susceptível não permitia vislumbrar a interação com sub-sítios da enzima como ocorre naturalmente com outras enzimas proteolíticas, conforme ensinado por Oliveira et al., 1976; Camargo et al., 1979, 1987; e, Jachieri et al., 1998. Estes dados, em consequência, sugeriram a importância do tamanho e conformação do substrato na determinação da especificidade da EOPA.

Inibidores da EOPA

O Estado da Técnica ensina que Ensaio com inibidores inicialmente realizados sugeriram que a EOPA era uma tiol-protease, pois ela é ativada pelo agente redutor ditioneitol (DTT) e inibida por reagentes tiol como o p-cloro-mercuribenzoato (PCMB) e o ácido 5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), inibidores clássicos de cisteinil-proteases (Oliveira et al., 1976; Camargo et al., 1983; Hayashi et al., 2000). Mais tarde, utilizando-se compostos que mimetizam os

(21)

substratos desta enzima (derivados da dinorfina) marcados com um grupamento tiol-reativo [Npys] (S-(3-nitro-2-piridinesulfenil) demonstrou-se a existência de um resíduo de cisteína crítico próximo ao sítio de catálise (Gomes et al., 1993; Hayashi et al., 1996) que reage irreversivelmente com o inibidor sitio-dirigido, fortalecendo a hipótese de que esta enzima é uma cisteinoprotease.

10 A EOPA é, portanto, uma endooligopeptidase tiol-ativável, insensível ao EDTA. Entretanto, pode ser inibida por compostos especialmente desenhados para a inibição de metaloproteases como o JA2, o cFP e o inibidor peptídico fosfínico 15 (Hayashi e col., 1996; Jiracek et al., 1995). O inibidor JA2 foi sintetizado a partir do cFP como um inibidor específico para a thimet oligopeptidase (Shrimpton et al., 2000), mas logo depois foi verificado pelos inventores que ambos 20 compostos também inibiam a EOPA com K_i semelhante (~17 nM).

Comportamento das endooligopeptidases com os inibidores PI, JA2, ATP e o anticorpo anti-EOPA:

Inibidor / Enzima	rEOPA	Thimet oligopeptidase	neurolisina
PI ⁽¹⁾	n.i.	n.i.	$K_i = 90 \mu\text{M}$
JA2 ⁽²⁾	$K_i = 17 \text{ nM}$	$K_i = 23 \text{ nM}$	n.i.

ATP ⁽³⁾	n.i.	$K_i = 42 \mu\text{M}$	n.i.
anti EOPA	100% de inibição	n.i.	n.i.

(1) Dauch e cols., 1991;

(2) Shrimpton e cols., 2000;

(3) Portaro e cols., 2001

Distribuição da EOPA no rato

5 A expressão da EOPA em diferentes tecidos e células do rato foi verificada através de métodos bioquímicos, imunológicos e de técnicas empregando a biologia molecular, ou seja, através da dosagem da sua atividade catalítica específica, 10 imunohistoquímica, e hibridização *in situ* e Northern blot, respectivamente. Através destes ensaios, foi possível determinar uma expressão mais acentuada da EOPA no cérebro, com fortes sinais de hibridização principalmente em algumas 15 camadas do córtex, hipocampo, cerebelo, e núcleo basal de Meynert, indicando um maior nível de transcrição do RNA mensageiro específico nestas regiões.

Além disto, estudos de distribuição 20 tecidual e celular por imunohistoquímica demonstraram a sua co-localização com os peptídeos opióides e seus precursores no sistema nervoso central, no corpo celular e axônios neuronais da retina de vertebrados, que são ricos em [Leu⁵]- 25 encefalina, conforme ensinamentos precursores de:

Oliveira et al., 1990; Paik et al., 1992; Ferro et al., 1991. Existem, ainda, evidências de que a EOPA seja secretada para o espaço extracelular de forma análoga a outras enzimas metabolizadoras de mensageiros peptídicos.

Dentre os tecidos estudados (cérebro, testículo, coração, baço, fígado, pulmão, músculo esquelético e rim) por análise da atividade proteolítica, observamos que o citosol do rim resultou em menores níveis de atividade determinada pela EOPA ou pela neurolisina. Ao contrário do observado para estas duas enzimas, a thimet oligopeptidase participa com 32% da ação total sobre o substrato Abz-GFAPFRQ-EDDnp neste tecido, revelando uma distribuição ubíqua desta enzima. A atividade da EOPA e da thimet-oligopeptidase está distribuída homogeneamente no citosol em geral, salvo exceções como o citosol do cérebro e do rim.

No citosol do cérebro, a EOPA tem distribuição preferencial, onde responde por 60% da atividade oligopeptidásica total. Neste citosol a atividade da thimet oligopeptidase não foi detectada e, além da EOPA, 20% da atividade observada neste citosol é devido à ação da neurolisina e 20% devido à ação de outras enzimas citosólicas que hidrolisam este substrato.

A fim de melhor demonstrar as características acima identificadas e integrantes do objeto da presente invenção, a Figura 1 evidencia tais achados através do Gráfico da Porcentagem de hidrólise do substrato Abz-GEAPFRQ-EDDnp pelas endooligopeptidases citosólicas.

Papel da endooligopeptidase A na formação do sistema nervoso central durante a embriogênese

Ensaio de hibridização *in situ* utilizando cortes de cérebro de ratos recém-natos ou embriões indicaram um aumento no nível de transcrição do RNA mensageiro codificante para a endooligopeptidase A principalmente no córtex, em embriões recém-natos em torno de dia 5 a 10 dias.

Além disto, os inventores da presente invenção identificaram e demonstraram uma alta conservação evolucionária do domínio "coiled-coil" das endooligopeptidases A expressas em diferentes animais como o homem, coelho, camundongo e rato, sendo que nestes animais esta mesma proteína foi denominada de Nude-L ou Nude2.

Esta estrutura em forma de hélice e sua capacidade de promover a interação com outras proteínas parecem estar relacionadas com a migração nuclear e neuronal, sugerindo uma função importante para esta estrutura dentro do processo de movimento celular que ocorre principalmente durante a embriogênese.

Pelos resultados obtidos foi possível comprovar que as proteínas homólogas a endooligopeptidase A isoladas do rato (Nude2, depositada no GenBank Acc. No. NM_133320) e do camundongo (Nude-L, depositada no GenBank Acc. No. AE323918) também apresentam atividade peptidásica frente aos substratos anteriormente empregados para a endooligopeptidase A (Hayashi et al., 2000), além de terem a sua atividade proteolítica bloqueada pelos inibidores específicos para a endooligopeptidase A. Estas proteínas parecem constituir uma nova família de proteínas que apresentam um N-terminal altamente conservado, caracterizado pela presença de uma estrutura "coiled-coil", e um domínio C-terminal mais divergente, mas que mesmo assim ainda apresentam fragmentos da sequência conservados mesmo em organismos distantes na escala evolutiva, como por exemplo, o *Aspergillus* [GenBank Acc. No. AE015037] (Sweeney et al., 2001; Kitagawa et al., 2000).

Ensaios utilizando a região promotora do gene da endooligopeptidase A de coelho como regulador da expressão de uma proteína repórter denominado GFP (Green Fluorescent Protein) possibilitou observar uma expressão tecido-específica em embriões de sapo (girinos). Os primeiros sinais de transcrição do gene repórter

foram observados a partir do estágio 13 a 15 de desenvolvimento embrionário, e que pode ser acompanhado até aproximadamente o estágio 40, onde não era mais possível manter o girino vivo. Nestes experimentos, espera-se que os fatores de transcrição (fatores "trans") que regulam a expressão do gene em questão através da sua interação com seqüências específicas presentes na região promotora (fatores "cis" de regulação da transcrição) indiquem, através da expressão da proteína repórter, os tecidos e os estágios de desenvolvimento em que a proteína alvo esteja sendo majoritariamente expressa. Portanto, estes estudos permitiram observar que a endooligopeptidase A estaria sendo principalmente expressa a partir do início da formação do tubo neural, durante a neurulação, na ectoderme neural e no prosencéfalo. Nos estágios mais tardios, foi possível ainda observar uma marcação específica de células do músculo esquelético, que formam a cauda do animal. Estes resultados foram corroborados por ensaios de hibridização *in situ* realizados com os embriões de *X. laevis* albinos inteiros ("whole mount *in situ* hybridization"), que confirmaram a existência de RNA mensageiros homólogos ao da endooligopeptidase A ao longo do eixo antero-posterior da região dorsal de embriões próximo ao estágio 19, e que aparentemente incluem os tecidos

neurais, mais precisamente o prosencéfalo e o rombencéfalo se estendendo pela medula espinhal e incluindo a crista neural. Além disto, considerando que homozigotos para mutações deletérias do gene da endooligopeptidase A são inviáveis, foram realizados ensaios de superexpressão desta proteína nos embriões de *X. laevis* através da injeção do RNA mensageiro específico transcrito *in vitro*, demonstrando que o excesso de produção da endooligopeptidase A parece interferir no processo normal de formação do sistema nervoso, tendo sido observado um retardo na formação e deslocamento na posição de formação do globo ocular, além de uma grave deformação na caixa craniana do animal.

Expressão da endooligopeptidase A em células neuronais e melanomas

A diferenciação neuronal *in vitro* a partir de células tronco pluripotentes tem-se constituído um modelo amplamente aceito para estudos básicos dos mecanismos moleculares envolvidos nas etapas iniciais da embriogênese. Estudos sobre a expressão e função da endooligopeptidase A foram realizados utilizando a linhagem P19 derivada de teratocarcinoma murino como modelo de diferenciação neuronal *in vitro*. Células-tronco embrionárias derivadas da camada central de

blastocistos têm sido usadas em estudos sobre o controle da expressão gênica. Elas são também potenciais candidatas como agentes terapêuticos em degenerações neuronais para o transplante de neurônios dopaminérgicos no tratamento de mal de Parkinson. As células embrionárias de carcinoma são facilmente manipuláveis em cultura, sendo normalmente obtidas a partir de neoplasias do tecido germinativo. Elas se comportam como células-tronco; possuindo um padrão de expressão gênico semelhante ao das células da camada interna de epiblastos e podem dar origem, em cultura, a células tipicamente endodérmicas, mesodérmicas ou mesmo ectodérmicas (Martin, 1980). As células totipotentes P19 (McBurney et al., 1982), derivadas de um teratocarcinoma murino, serão utilizadas como modelo de diferenciação *in vitro* e para a identificação de fatores necessários para o seu comprometimento irreversível com diferentes vias de diferenciação. Células P19 não diferenciadas se caracterizam por altas taxas de proliferação, sendo que tanto altas densidades nas culturas celulares aderidas, quanto o crescimento em suspensão induzem sua diferenciação. Tal processo pode ser igualmente desencadeado por fatores químicos como o ácido retinóico ou DMSO. Sabe-se, por exemplo, que na presença de 10^{-7} M de ácido retinóico as células P19 se diferenciam em

células neuroectodérmicas (Jones-Villeneuve et al., 1982).

Em protocolos baseados no impedimento da adesão, agregados celulares são mantidos em suspensão por cinco dias dando origem aos seguintes tipos celulares: no sétimo dia surgem neurônios e no décimo dia surgem astrócitos e células da glia. De forma análoga, a variação da natureza e concentração de um indutor químico pode acarretar múltiplas vias de diferenciação de P19 em células de músculo liso ou esquelético, neurônios ou astrócitos (Edward and McBurney, 1983). Os estudos levados a efeito pelos inventores, demonstram uma expressão aumentada do RNA mensageiro da endooligopeptidase A nos corpúsculos embrionários e nas células em diferenciação, aproximadamente no 8º dia após o tratamento com o ácido retinóico, fase esta em que se observa a formação dos neuritos. Este estudo visa principalmente contribuir para o entendimento da função da endooligopeptidase A, que deve ser modulada aos níveis gênico e protéico durante o processo de diferenciação neuronal.

As células da linhagem PC12 são derivadas de um tumor de rato (transplantable rat pheochromocytoma) que responde reversivelmente ao NGF (nerve growth factor) que induz a um fenótipo neuronal e adere muito pouco ao plástico,

apresentando a tendência a crescer formando pequenos "clusters" (Greene et al., 1976). Quando crescido em cultura em condições normais, estas células se assemelham a células cromafínicas de adrenal de feto, tanto no aspecto bioquímico como no morfológico. Elas podem ser diferenciadas de duas maneiras: (1) para células cromafínicas, semelhante frente a glucocorticóides, e (2) para células neuronais simpáticas frente a fatores neurotróficos como o NGF ou FGF (fibroblast growth factor). Além disto, estas células expressam vários peptídeos bioativos como as encefalinas, dinorfinas e neurotensina.

Estas propriedades fazem desta linhagem um modelo experimental bastante interessante para o estudo de enzimas envolvida na biotransformação de neuropeptídeos. Utilizando esta linhagem, demonstramos que a atividade proteolítica da endooligopeptidase A estava presente no citosol destas células e que esta atividade era modulada frente à adição de CAMP e não frente ao tratamento com FGF.

Por outro lado, sabe-se que o tratamento desta linhagem com FGF determina a diferenciação destas células para um fenótipo neuronal sendo observado a formação de prolongamentos axonais. A endooligopeptidase A presente nestas células tratadas com FGF migram para a extremidade destes

neuritos, sugerindo um possível papel no processo de formação destas extensões celulares ou na formação de conexões com outras células. NA seqüência realizam-se estudos para esclarecer a real função desta proteína nestas células .

Papel da endooligopeptidase A no processo de apresentação de antígenos


Sabendo-se que os opióides também são agentes imunomoduladores (Blalock, 1989) e considerando ainda a presença da EOPA em células do sistema imune, foi sugerido um possível papel desta enzima também no sistema imunológico (Paik e cols., 1992). Estes dados, associados ao fato de que o tamanho dos antígenos apresentados em associação como MHC classe I (Engelhard, 1994) ser coincidente com o tamanho requerido para a ligação com estas endooligopeptidases (de 7 a 13 resíduos de aminoácidos), levaram os pesquisadores da presente invenção a investigar a sua possível participação no processo de seleção do que é próprio do organismo ou não. A participação da thimet-oligopeptidase no processo de apresentação de antígenos MHC classe I também foi alvo das pesquisas dos inventores da presente invenção, uma vez que os epítomos apresentados são oligopeptídeos de 7 a 13 resíduos de aminoácidos e comportam-se como inibidores competitivos desta

enzima. Resultados semelhantes têm sido reproduzidos *in vitro* com a rEOPA, embora existam diferenças sutis entre a especificidade da EOPA e da thimet oligopeptidase. Verificamos que a

5 diminuição dos níveis de linfoproliferação observada frente à adição de inibidores das oligopeptidases em células de apresentação de antígenos é devido principalmente à inibição da EOPA, sugerindo que essa enzima possa estar

10 envolvida na rota de apresentação de antígenos MHC classe I. Como a expressão do MHC classe I em tecido nervoso está relacionada a processos infecciosos, degenerativos (Piehl and Lidman, 2001) e na plasticidade do SNC (Huh et al., 2000),

15 o controle da atividade peptidásica ou chaperon da EOPA explica seu envolvimento nesses processos que evidentemente seriam influenciados por inibidores específicos da EOPA.



Referências

- Blalock, J.E. (1989) A molecular basis for bi-directional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* **69**, 1 - 32.
- Camargo, A.C., Caldo, H., and Emson, P.C. (1983) Degradation of neurotensin by rabbit brain endo-oligopeptidase A and endo-oligopeptidase B (proline-endopeptidase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 1151 - 1159.
- Camargo, A.C., Caldo, H., and Reis, M.L. (1979) Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. *J. Biol. Chem.* **254**, 5304 - 5307.
- Camargo, A.C., Gomes, M.D., Reichl, A.P., Ferro, E.S., Jacchieri, S., Hirata, I.Y., and Juliano, L. (1997) Structural features that make oligopeptides susceptible substrates for hydrolysis by recombinant thimet oligopeptidase. *Biochem. J.* **324**, 517 - 522.
- Camargo, A.C., Gomes, M.D., Toffoletto, O., Ribeiro, M.J., Ferro, E.S., Fernandes, B.L., Suzuki, K., Sasaki, Y., and Juliano, L. (1994) Structural requirements of bioactive peptides for interaction with endopeptidase 22.19. *Neuropeptides* **26**, 281 - 287.

Camargo, A.C., Oliveira, E.B., Toffoletto, O.,
Metters, K.M., and Rossier, J. (1987) Brain
endo-oligopeptidase A, a putative enkephalin
converting enzyme. *J. Neurochem.* **48**, 1258 -
1263.

Camargo, A.C., Ribeiro, M.J., and Schwartz, W.N.
(1985) Conversion and inactivation of opioid
peptides by rabbit brain endo-oligopeptidase
A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 932 -
938.

Camargo, A.C., Shapanka, R., and Greene, L.J.
(1973) Preparation, assay, and partial
characterization of a neutral endopeptidase
from rabbit brain. *Biochemistry* **12**, 1838 -
1844.

Dauch, P., Vincent, J. P., and Checler, F. (1991)
Specific inhibition of endopeptidase 24.16 by
dipeptides. *Eur. J. Biochem.* **202**, 269 - 276.

Edwards, M.K.S., and McBurney, M.W. (1983). The
concentration of retinoic acid determines the
differentiated cell types formed by a
teratocarcinoma cell line. *Dev. Biol.* **98**, 187
- 191.

Engelhard, V.H. (1994) Structure of peptides
associated with MHC class I molecules. *Curr.*
Opin. Immunol. **6**, 13 - 23.

Ferro, E.S., Hamassaki, D.E., Camargo, A.C., and
Britto, L.R. (1991) Endo-oligopeptidase A, a

putative enkephalin-generating enzyme, in the vertebrate retina. *J. Neurochem.* **57**, 1643 - 1649.

Ferro, E.S., Tambourgi, D.V., Gobersztejn, F.,

Gomes, M.D., Sucupira, M., Armelin, M.C.,

Kipnis, T.L., and Camargo, A.C. (1993)

Secretion of a neuropeptide-metabolizing enzyme similar to endopeptidase 22.19 by

glioma C6 cells. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. **191**, 275 - 281.

Gomes, M.D., Juliano, L., Ferro, E.S., Matsueda,

R., and Camargo, A.C. (1993) Dynorphin-derived

peptides reveal the presence of a critical

cysteine for the activity of brain endo-

oligopeptidase A. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. **197**, 501 - 507.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976)

Establishment of a noradrenergic clonal line

of rat adrenal pheochromocytoma cells which

respond to nerve growth factor. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA **73**, 2424 - 2428.

Hayashi, M. A. F., Portaro, F. C. V., Tambourgi,

D. V., Sucupira, M., Yamane, T., Fernandes, B.

L., Ferro, E. S., Rebouças, N. A., and

Camargo, A. C. M. (2000) Molecular and

immunochemical evidences demonstrate that

endooligopeptidase A is the predominant

cytosolic oligopeptidase of rabbit brain.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **269**, 7-13.

Hayashi, M. A., Gomes, M. D., Rebouças, N.,

Fernandes, B. L., Ferro, E. S., and Camargo,

5 A. C. M. (1996) Species specificity of thimet

oligopeptidase (EC 3.4.24.15). *Biol. Chem.*

Hoppe-Seyler **377**, 283-291.

Hayashi, M.A., Pires, R.S., Rebouças, N.A.,

Britto, L.R., and Camargo, A.C. (2001)

10 Expression of endo-oligopeptidase A in the rat

central nervous system: a non-radioactive in

situ hybridization study. *Brain Res. Mol.*

Brain Res. **89**, 86 - 93.

Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme,

15 P.A., Brotz, T.M., and Shatz, C.J. (2000)

Functional requirement for class I MHC in CNS

development and plasticity. *Science* **290**, 2155

- 2159.

Jacchiéri, S.G., Gomes, M.D., Juliano, L., and

20 Camargo, A.C. (1998) A comparative

conformational analysis of thimet

oligopeptidase (EC 3.4.24.15) substrates. *J.*

Pept. Res. **51**, 452 - 429.

Jiracek, J., Yiotakis, A., Vincent, B., Lecoq, A.,

25 Nicolaou, A., Checler, F., and Dive, V. (1995)

Development of highly potent and selective

phosphinic peptide inhibitors of zinc

endopeptidase 24-15 using combinatorial chemistry. *J. Biol. Chem.* **270**, 21701 - 21706.

Jones-Villeneuve, E.M.V.; McBurney, M.W.; Rogers, K.A.; Kalnins, V.I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.* **94**, 253 - 262.

Kitagawa, M., Umezu, M., Aoki, J., Koizumi, H., Arai, H., and Inoue, K. (2000). Direct association of Lis1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE. *FEBS Letts.* **479**, 57 - 62.

Martin, G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* **209**, 768 - 776.

McBurney, M.W.; Jones-Villeneuve, E.M.V.; Edwards, M.K.S.; Anderson, P.J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**, 165 - 167.

Medeiros, M.S., Iazigi, N., Camargo, A.C., and Oliveira, E.B. (1992) Distribution and properties of endo-oligopeptidases A and B in the human neuroendocrine system. *J. Endocrinol.* **135**, 579 - 588.

Oliveira, E.B., Martins, A.R., and Camargo, A.C. (1976) Isolation of brain endopeptidases:

controls oligopeptide degradation in
macrophage. *Eur. J. Biochem.* **268**, 887 - 894.

Rogister, B.; Ben-Hur, T.; Dubois-Dalcq, M.
(1999). From neural stem cells to myelinating
5 oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 287
- 300.

Shrimpton, C.N., Abbenante, G., Lew, R.A., and
Smith, I. (2000) Development and
10 characterization of novel potent and stable
inhibitors of endopeptidase EC 3.4.24.15.
Biochem. J. **345**, 351 - 356.

Silva, C.L., Portaro, F.C., Bonato, V.L., Camargo,
A.C., and Ferro, E.S. (1999) Thimet
15 oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein
on the route of MHC class I antigen
presentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
255, 591 - 595.

Sweeney, K.J., Prokscha, A., and Eichele, G.
(2001) NudE-L, a novel Lis1-interacting
20 protein, belongs to a family of vertebrate
coiled-coil proteins. *Mech. Dev.* **101**, 21 - 33

Vincent, B., Beaudet, A., Dauch, P., Vincent,
J.P., and Checler, F. (1996) Distinct properties
of neuronal and astrocytic endopeptidase
25 3.4.24.16: a study on differentiation, subcellular
distribution and secretion processes. *J.*
Neuroscience **15**, 5049 - 5059.

REIVINDICAÇÕES

Reivindicação 1 - Processo para a determinação da estrutura primária do RNA mensageiro codificante para a Endooligopeptidase Humana Recombinante - EOPA e da sua sequência protéica, particularmente de mamíferos, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) isolamento do RNA total de vários tecidos de animais, especificamente humano, através do método de extração com isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio ou utilizando o reagente Trizol® (GibcoBRL);

b) purificação do RNA mensageiro a partir do RNA total obtido acima utilizando oligo dT celulose empacotado em colunas ou com a resina na forma de suspensão;

c) análise da qualidade do RNA mensageiro obtido através da eletroforese em gel de agarose denaturante (contendo 1 a 2,5 % de formaldeído), seguido de coloração com brometo de etídeo ou corantes de ácidos nucleicos como o "Syber Green" (Molecular Dynamics), de fotodocumentação, e de análise por hibridização (Northern blot);

d) clonagem do RNA mensageiro obtido em vetor plasmidial, cosmídio ou fagos, de forma a permitir a sua amplificação "in vitro";

(40)

e) identificação e isolamento do inserto de cDNA codificante para a EOPA através da seleção de clones por hibridização, imuno-seleção com anticorpo específico anti-EOPA ou através da detecção da atividade específica da EOPA;

f) amplificação e isolamento do inserto de cDNA desejado por PCR ("polymerase chain reaction") ou por simples amplificação do vetor contendo este cDNA (crescimento de bactérias transformadas com o clone contendo o inserto de cDNA codificante para a EOPA) seguido de digestão com enzimas de restrição que permitam o seu isolamento;

Reivindicação 2 - Processo, conforme reivindicação 1, caracterizado por, a amplificação do cDNA desejado também poder ser realizada através da amplificação direta por PCR a partir do RNA mensageiro ou RNA total utilizando oligonucleotídeos específicos (RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction);

Reivindicação 3 - Processo, conforme reivindicação 2, caracterizado por, o cDNA, identificado e isolado, ser submetido ao seqüenciamento de toda a sua cadeia para permitir a determinação e dedução da respectiva seqüência primária, possibilitar a análise da estrutura primária e ou secundária da respectiva proteína, e permitir a análise de

homologias com outras seqüências já anteriormente depositadas em bancos de dados específicos e disponíveis.

Reivindicação 4 - Processo de produção da EOPA humana recombinante, para a EOPA isolada e identificada conforme reivindicação 1, especificamente em bactérias, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) o cDNA codificante para a EOPA, isolado e identificado, deverá ser subclonado, em fase de leitura aberta, em vetor de expressão plasmidial que permita a produção da proteína desejada - EOPA, na forma recombinante ou na forma de fusão com proteínas ou oligopeptídeos âncora que permitam ou facilitem o processo de purificação da mesma;

b) transformação de células hospedeiras (bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α ou BL21(DE3) ou similar) com a construção plasmidial contendo o inserto de cDNA codificante para a EOPA clonado em fase de leitura aberta em vetor de expressão descrita na etapa a);

c) as bactérias transformadas obtidas são amplificadas através do seu cultivo em meio de cultura apropriado, tal como, meio LB contendo antibiótico de seleção, até atingir densidade

ótica de aproximadamente 0,6 para leituras a 560 a 600 nm;

5 d) as bactérias contendo a proteína desejada são coletadas por centrifugação e podem ser estocadas a -20°C ou podem ser processadas imediatamente, devendo serem rompidas, por sonicação ou pressão mecânica, para que a proteína recombinante ou de fusão, presente no seu citoplasma, seja liberada para o meio, onde a proteína na forma de fusão poderá ser recuperada e purificada utilizando colunas de afinidade, eletroforese ou cromatografia em fase líquida;

10 e) avaliação da pureza e qualidade da proteína recombinante assim obtida através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE), Western blot, espectroscopia de massa, e medidas da sua atividade específica por cinética enzimática utilizando substratos peptídicos sintéticos ou naturais.

Reivindicação 5 - Processo conforme reivindicação

4, caracterizado por, a transformação de células hospedeiras poder ser realizada por simples choque térmico (transformação por "heat-shock") ou por eletroporação, em bactérias previamente preparadas para cada um destes fins.

Reivindicação 6 - Processo conforme reivindicação 4, caracterizado por, na fase em que as bactérias transformadas obtidas são amplificadas através do seu cultivo em meio de cultura apropriado, a produção da proteína desejada é induzida através da adição de compostos indutores de expressão, como por exemplo o IPTG (isopropyl-tiogalactosidade) na concentração final em torno de 0,5 a 1 mM, seguido de incubação a 30°C a 37°C, sob agitação.

Reivindicação 7 - Processo, conforme reivindicação 4, caracterizado por, quando a proteína é produzida na forma de fusão, a mesma é separada das demais proteínas solúveis da bactéria (proteínas contaminantes) através da utilização de colunas de afinidade contendo o metal níquel imobilizado para fusão com poli-histidinas ou a resina glutathiona-sepharose para as proteínas em fusão com a GST (glutathiona-S-transferase); e ainda, em seguida, a proteína recombinante então poderá ser obtida através da clivagem da proteína ou polipeptídeo âncora através da digestão com proteases específicas, tais como trombina, fator X, enteroquinase, etc., cuja sequência consenso de reconhecimento e de clivagem tenha sido previamente inserido no sítio de fusão entre a âncora e a proteína recombinante desejada.

Reivindicação 8 - Processo de determinação da estrutura primária do gene da EOPA humana, com base no processo da reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência completa do gene humano que codifica para a EOPA foi determinada através da análise da sequência do genoma humano disponível interativamente em bancos de dados públicos; identificação da constituição do referido gene como sendo 9 exons e 10 introns, estendendo-se por aproximadamente 40 kb, e estando localizado no cromossomo 17p12.9, relativamente próximo do locus do gene da p53 (aproximadamente 0,7 cM), e está no mesmo braço do cromossomo 17 onde se encontra o gene da Lisl (17p13.3); no segmento 5' a montante do gene, englobando a região promotora, são encontrados sítios de ligação para fatores de regulação de transcrição, tais como: AP1, cMyb, SP1, nMyc, cMyc, entre outros.

Reivindicação 9 - Processo de geração do anticorpo anti-EOPA, especificamente anti-EOPA humana policlonais e em camundongos, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) geração dos anticorpos policlonais através de imunizações com a EOPA natural purificada do cérebro de animais ou com a proteína recombinante ativa produzida em bactérias;

- b) realização das imunizações em camundongos da linhagem Balb-C ou High III, com 7 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 a 22 g;
- c) injeção por via intradérmica de 2 µg da proteína purificada ou 3 µg da proteína recombinante absorvida em hidróxido de alumínio $[Al(OH)_3]$ ou em adjuvante incompleto de Freund em intervalos semanais ou mensais, para cada uma das quatro imunizações;
- d) coleta de amostras do sangue uma semana ou um mês após a última imunização e estocagem do soro a $-20^{\circ}C$;
- e) avaliação do título do anti-soro obtido através de ensaios de ELISA e Western blot utilizando o antígeno apropriado;
- f) Avaliação utilizando o peptídeo natural bradicinina como substrato, onde a sua clivagem foi monitorada por HPLC, e verificação que o anti-soro obtido é capaz de bloquear a atividade peptidásica da EOPA.

Reivindicação 10 - Processo de caracterização das propriedades bioquímicas e proteolíticas da EOPA, a partir dos processos descritos nas reivindicações 1 ou 4, caracterizado pelo fato de utilizar-se ensaios cinéticos e empregar-se substratos peptídicos naturais e sintéticos; obter-se proteína natural e recombinante apresentando

exatamente as mesmas características bioquímicas e de especificidade.

Reivindicação 11 - Processo, conforme reivindicação 10, caracterizado por A EOPA
5 caracterizar-se como uma endopeptidase tiol-ativável, insensível ao EDTA, com peso molecular em torno de 43 kDa, podendo estar associada a outras proteínas do citosol gerando complexos de massa molecular em torno de 70 kDa.

10 Reivindicação 12 - Processo, conforme reivindicação 10, caracterizado por, a proteína natural, assim como a recombinante, ser capaz de hidrolisar seletivamente peptídeos de 7 a 13
15 resíduos de aminoácidos, e apresentar ponto isoelétrico entre 5,22 e 5,50, esta enzima hidrolisando especificamente a ligação Phe⁵-Ser⁶ da bradicinina e a ligação Arg⁸-Arg⁹ da neurotensina, e liberando ainda [Met⁵]- ou [Leu⁵]-encefalinas de
20 seqüência.

Reivindicação 13 - Processo, conforme reivindicação 10, caracterizado por serem utilizados diversos neuropeptídeos como substrato, evidenciar-se que a seqüência primária do
25 substrato ao redor da ligação peptídica susceptível não permite vislumbrar a interação com sub-sítios da enzima, como ocorre naturalmente com

outras enzimas proteolíticas, e de definir-se a correlação e importância do tamanho e conformação do substrato para a determinação da especificidade da EOPA.

5 **Reivindicação 14 - Processo de identificação de inibidores da EOPA**, reconhecida como uma tiol-protease ativada pelo agente redutor ditioneitol (DTT) e inibida por inibidores clássicos de cisteinil-proteases como os reagentes tiol, tais como, o p-cloro-mercuribenzoato (PCMB) e o ácido 5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), **caracterizado pelo fato de que** utilizam-se compostos que mimetizam os substratos desta enzima, tais como derivados da dinorfina, marcados com um grupamento tiol-reativo [Npys] (S-(3-nitro-2-piridinesulfenil) e identifica-se a existência de um resíduo de cisteína crítico próximo ao sítio de catálise que reage irreversivelmente com o inibidor sítio-dirigido, e identifica-se, finalmente, esta enzima, como uma cisteinoprotease.

10

15

20

Reivindicação 15 - Processo de identificação de inibidores da EOPA, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por**, A EOPA ser identificada como uma endooligopeptidase tiol-ativável, insensível ao EDTA.

25

Reivindicação 16 - Anticorpos inibidores da atividade catalítica e de interação com oligopeptídeos, identificados pelo processo da reivindicação 14, caracterizado por, A EOPA ser inibida por compostos especialmente desenhados para a inibição de metaloproteases, como o JA2, o cFP e o inibidor peptídico fosfínico, sendo que o inibidor JA2 é sintetizado a partir do cFP como um inibidor específico para a thimet oligopeptidase.

10 Reivindicação 17 - Anticorpos, conforme reivindicação 16, caracterizado por, ambos os compostos também inibirem a EOPA com K_i semelhante (~ 17 nM).

Reivindicação 18 - Processo de identificação, conforme reivindicação 14, para a determinação da distribuição da EOPA em ratos através da determinação de sua atividade catalítica específica, imuno-histoquímica, hibridização "in situ" e por Northern blot caracterizado pelo fato de que dentre os tecidos do cérebro, testículo, coração, baço, fígado, pulmão, músculo esquelético e rim, analisados através da dosagem da atividade proteolítica específica, o citosol do rim resulta nos menores níveis de atividade característica da EOPA, a thimet oligopeptidase participa com 32% da ação total sobre o substrato Abz-GFAPFRQ-EDDnp neste tecido, em face de uma distribuição ubíqua

desta enzima, e a atividade da EOPA e da thimet-oligopeptidase está distribuída homogeneamente no citosol em geral, salvo exceções como o citosol do cérebro e do rim.

- 5 **Reivindicação 19 - Processo de identificação,**
conforme reivindicação 18, caracterizado pelo fato
de que no citosol do cérebro, a EOPA tem
distribuição preferencial, onde responde por 60%
da atividade oligopeptidásica total, a atividade
10 da thimet oligopeptidase não é detectada e, além
da EOPA, identificar-se que 20% da atividade neste
citosol é devido à ação da neurolisina e 20%
devido à ação de outras enzimas citosólicas que
hidrolisam este substrato; utilizar-se Ensaaios de
15 hibridização "in situ", sendo que a expressão da
EOPA é mais acentuada no cérebro, com sinais de
hibridização mais fortes em algumas camadas do
córtex, hipocampo, cerebelo, e núcleo basal de
Meynert, em face de um maior nível de transcrição
20 do RNA mensageiro específico nestas regiões.

- Reivindicação 20 - Processo de identificação,**
conforme reivindicação 18 ou 19, caracterizado
pelo fato de que através de estudos de
imunohistoquímica de distribuição tecidual e
25 celular identifica-se a co-localização da EOPA com
os peptídeos opióides e seus precursores no
sistema nervoso central, no corpo celular e

(50)

axônios neuronais da retina de vertebrados, que são ricos em [Leu⁵]-encefalina.

Reivindicação 21 - Processo de identificação, conforme reivindicação 20, caracterizado pelo fato
5 da EOPA ser secretada para o espaço extracelular de forma análoga a outras enzimas metabolizadoras de mensageiros peptídicos.

Reivindicação 22 - Método de Identificação de Condições de Patologias Congênitas, infecciosas e
10 **degenerativas do sistema nervoso central, pela** determinação da atuação da EOPA no processo de formação do sistema nervoso central durante a embriogênese, **caracterizado pelo fato de que** são efetuados ensaios de hibridização *in situ* de
15 cortes de cérebro de ratos recém-natos ou embriões; identificação do aumento no nível de transcrição do RNA mensageiro codificante para a endooligopeptidase A, principalmente no córtex, em embriões recém-natos com idades em torno de 5 a 10
20 dias; identificação do domínio "Coiled-Coil" das endooligopeptidases A, que se apresentam com estrutura em forma de hélice e capacidade de promover a interação com outras proteínas.

Reivindicação 23 - Método, conforme reivindicação
25 **22, caracterizado por, as endooligopeptidases A** identificadas apresentarem alta conservação evolucionária do domínio "coiled coil", expressas

em diferentes animais, tais como o homem, coelho, camundongo e rato (proteína Nude-L ou Nude2).

Reivindicação 24 - Método, conforme reivindicação 22, caracterizado por, as endooligopeptidases A com estrutura em forma de hélice estão relacionadas com a migração nuclear e neuronal, esta estrutura possuindo função importante no processo de movimento celular que ocorre durante a embriogênese.

Reivindicação 25 - Método, conforme reivindicação 22, caracterizado por, as proteínas homólogas às endooligopeptidases A isoladas do rato (Nude2, GenBank Acc. No. NM_133320) e do camundongo (Nude-L, GenBank Acc. No. AF323918) também apresentarem atividade peptidásica frente aos substratos empregados para a EOPA, além de terem a sua atividade proteolítica bloqueada pelos inibidores específicos para a EOPA.

Reivindicação 26 - Método, conforme reivindicação 22, mediante a detecção e determinação do papel da EOPA em células mantidas em cultura, caracterizado por, através de ensaios, identificar expressão aumentada do RNA mensageiro da endooligopeptidase A nos corpúsculos embrionários e nas células em diferenciação, em torno do 8º dia após o tratamento dos mesmos com ácido retinóico, ocorrendo a formação dos neuritos, e utilizar as

células totipotentes P19 derivadas de um teratocarcinoma murino, como modelo de diferenciação *in vitro* e para a identificação de fatores necessários para o seu comprometimento irreversível com diferentes vias de diferenciação.

Reivindicação 27 - Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por, a função da endooligopeptidase A, ser modulada aos níveis gênico e protéico durante o processo de diferenciação neuronal; a atividade proteolítica da EOPA estar presente no citosol de células da linhagem PC12 derivadas de um tumor de rato (transplantable rat pheochromocytoma), sendo esta atividade modulada frente à adição de cAMP.

Reivindicação 28 - Método, conforme reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o tratamento desta linhagem PC12 com FGF determina a diferenciação destas células para um fenótipo neuronal, observando-se a formação de prolongamentos axonais, e a migração da EOPA presente nestas células tratadas com FGF, para a extremidade destes neuritos, em face do seu papel no processo de formação destas extensões celulares ou na formação de conexões com outras células.

Reivindicação 29 - Método de determinação do papel da EOPA em processos imunológicos, caracterizado

pelo fato de que o tamanho dos antígenos apresentados em associação com MHC classe I é coincidente com o tamanho requerido para a ligação com a EOPA (de 7 a 13 resíduos de aminoácidos), os epítomos comportam-se como inibidores competitivos desta enzima, os opióides também são agentes imunomoduladores e a EOPA também é encontrada em células do sistema imune, mais particularmente, em macrófagos e linfócitos; a expressão do MHC classe I em tecido nervoso está relacionada a processos infecciosos, degenerativos e na plasticidade do SNC, e que o controle da atividade peptidásica ou chaperon da EOPA está diretamente relacionado ao seu envolvimento nesses processos que são influenciados por inibidores específicos da EOPA.

Reivindicação 30 - Método de Diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças congênitas, infecciosas e degenerativas do Sistema Nervoso Central (SCN), de acordo com o método de identificação da reivindicação 22, caracterizado pelo uso da sequência da EOPA no diagnóstico, prevenção e tratamento dessas patologias.

Reivindicação 31 - Uso de inibidores, competidores e seus derivados, para o tratamento de patologias neurológicas e degenerações teciduais, caracterizado pelo fato de serem empregados

inibidores e antagonistas da EOPA, na prevenção e tratamento dessas doenças.

Reivindicação 32 - Uso, conforme reivindicação 30 ou 31, caracterizado pela utilização de 5 inibidores, anticorpos ou competidores que interfiram na atividade proteolítica e/ou chaperona da hEOPA, no diagnóstico, prevenção ou tratamento dessas doenças.

Reivindicação 33 - Uso, conforme reivindicação 32, 10 caracterizado por, o desenvolvimento de inibidores para a EOPA ser feito a partir de modelos estruturais de toxinas encontradas em substâncias naturais, especialmente em venenos animais.

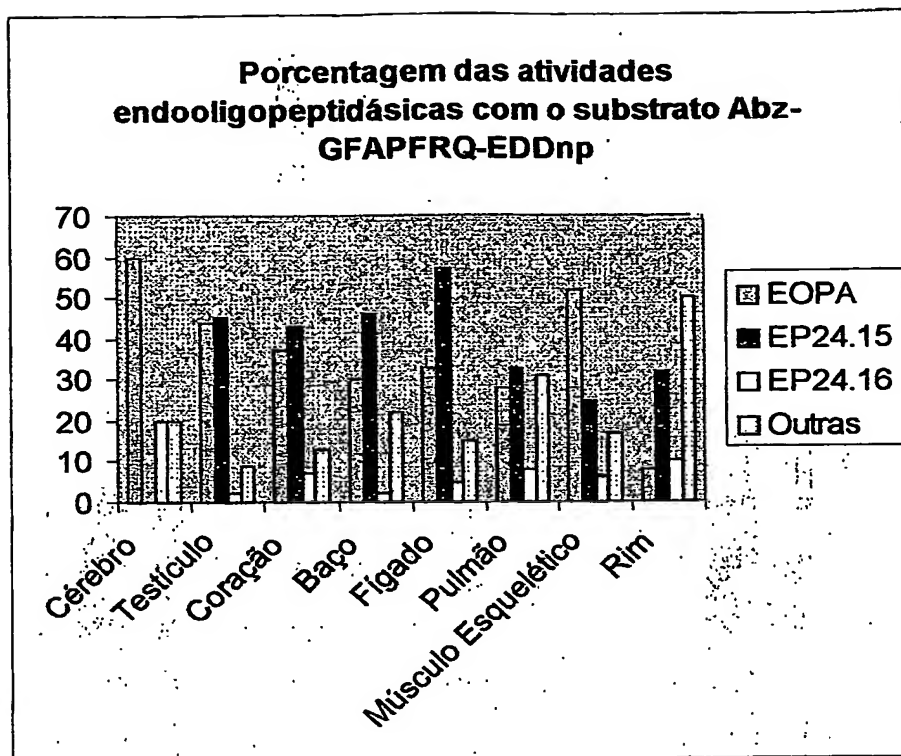
Reivindicação 34 - Uso, conforme reivindicação 33, 15 caracterizado por, ser para o preparo de compostos ou drogas que interfiram no processo de inativação ou biotransformação de neuropeptídeos promovido pela hEOPA.

Reivindicação 35 - Uso, conforme reivindicação 34, 20 caracterizado por, ser feito através de inibidores peptídeos que desloquem outros peptídeos do centro ativo da hEOPA.

Reivindicação 36 - Uso, conforme reivindicação 34, caracterizado por, ser através de inibidores da 25 atividade proteolítica/chaperona da EOPA que influenciam a linfoproliferação ou outro papel que

o complexo MHC-classe I pode exercer nos processos infecciosos, degenerativos e de plasticidade do SNC.

(50)

**FIGURA 1**

RESUMO

Processo para a determinação da estrutura primária do RNA mensageiro codificante para a Endooligopeptidase Humana Recombinante - A hEOPA e da sua sequência protéica, para a determinação do gene da EOPA Humana e para a produção da EOPA humana recombinante; Processo de geração de anti-corpo anti-EOPA Humana policlonais e em camundongos; Processo de caracterização e substratos sintéticos das propriedades Bioquímicas e Proteolíticas da hEOPA; Processo de identificação de inibidores da EOPA E Anticorpos inibidores da atividade catalítica e de interação com oligopeptídeos; Competidores e Antagonistas; Método de identificação de condições de patologias congênitas, infecciosas e degenerativas do sistema nervoso central e de determinação do papel da EOPA em processos imunológicos; Método de Diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças congênitas, infecciosas e degenerativas do Sistema nervoso Central; Uso de Inibidores e competidores e seus derivados, para o tratamento de patologias neurológicas e degenerações teciduais.

A invenção refere-se a endooligopeptidase A humana (hEOPA) recombinante, polinucleotídeos que codificam para a A hEOPA, polinucleotídeos que

indentificam a expressão da hEOPA em animais e humanos, substratos sintéticos utilizados para a determinação da atividade proteolítica e chaperona da hEOPA, anticorpos específicos e inibidores da sua atividade catalítica e de interação com oligopeptídeos, competidores e antagonistas da sua interação com outras proteínas e formação de complexos protéicos. A invenção também se refere a métodos para diagnóstico e/ou identificação de condições de patologias congênitas, infecciosas e degenerativas do sistema nervoso central e para disfunções psiquiátricas e de comportamento. Propõe ainda, a aplicação de inibidores e competidores, incluindo anticorpos ou seus derivados, para o tratamento de patologias neurológicas e degenerações teciduais.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.